

# 人體及環境中金黃色葡萄球菌 對抗生素抗藥性之研究

房樹生 洪梅芳 陳韻曲 姚佩萱 江欣曄  
臺南縣私立港明高中

## 摘 要

我們發現 LSM 選擇性培養基分離金黃色葡萄球菌的效果最好，而且僅由菌落特徵即可 100% 正確判斷是否為金黃色葡萄球菌。從人體分離金黃色葡萄球菌以咽喉分離率最高 60%，其次為口腔黏膜 42.5%，鼻腔 35%，皮膚則是 0%；至於水溝中的分離率為 0%。抗藥性比例的嚴重性依序為學校水溝 < 正常人體 < 臨床病人。最後，我們證實了抗生素濫用會導致抗藥性金黃色葡萄球菌的增生。

關鍵詞彙：金黃色葡萄球菌、抗生素感受性試驗

## 一、前言

從報章雜誌中經常看到有關細菌抗藥性的報導，甚至在英國還曾出現抗萬古黴素 (Vancomycin) 的細菌，而且原本已經受到控制的肺結核桿菌，新的病例也越來越多，人類和細菌間的戰爭似乎仍方興未艾，且有漸漸居於劣勢的趨勢 (詹前朕等 1995，Prescott 等 1993，劉鳳炫等 1996)。

細菌的抗藥性是一種生理性適應，和細菌在環境中接觸到抗生素的機率有關，因此抗生素濫用越嚴重的地區，其抗藥性的問題也越明顯 (劉鳳炫等 1996，謝素娥等 1995)。

目前在醫院中金黃色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 的抗藥性十分普遍及嚴重，我們便想看看一般正常人及環境中的金黃色葡萄球菌抗藥性的比例是否和醫院中一樣嚴重，或者是比較輕微。

因此首先必須挑選一種有效的選擇性培養

基，可快速且準確地分離出金黃色葡萄球菌 (Prescott LM 等 1993，Merlino J 等 1996)。其次我們想知道金黃色葡萄球菌在正常人體的不同部位 (口腔黏膜、咽喉、鼻腔、皮膚) 及環境中 (學校水溝) 出現的比例為何，並做抗生素感受性試驗，將其抗藥性比例和成大醫學院病理部細菌室的臨床病人數據作比較，看看結果是否如同我們所想像的：醫院病人身上的金黃色葡萄球菌抗藥性比較嚴重。最後，我們想探討抗生素濫用和金黃色葡萄球菌產生抗藥性之間的關聯性。

## 二、研究設備器材

### (一) 培養基：

1. Mannitol Salt Agar (MS) (木蜜醇培養基)：
- 每公升水含
- |                                |      |
|--------------------------------|------|
| Pancreatic Digest of Casein    | 5.0g |
| Peptic Digest of Animal Tissue | 5.0g |
| Beef Extract                   | 1.0g |

Sodium Chloride.....	75.0g
D-Mannitol.....	10.0g
Phenol Red.....	0.025g
Agar.....	15.0g
2. Blood Agar Plate (BAP) (血液培養基) : TSII with 5% Sheep Blood	
3. Lipovitellin-Salt-Mannitol agar (LSM) (木 蜜醇蛋黃培養基) : 配方同 MS , 另外加 20mg/ml 蛋黃	
4. Miller Luria Bertani Broth (LB) : 每公升水含 Casin Enzymic Hydrolysate.....	
Yeast Extract.....	10.0g
Sodium Chloride.....	5.0g
Agar.....	10.0g
5. Mueller Hinton II Agar (MH) : 每公升水含 Beef Extract.....	
Acid Hydrolysate of Casein.....	2.0g
Starch.....	17.5g
Agar.....	1.5g
6. Trypticase Soy Broth (TSB) : 每公升水含 Pancreatic Digest of Casein.....	
Papaic Digest of Soybean Meal.....	17.0g
Sodium Chloride.....	3.0g
Dipotassium Phosphate.....	5.0g
Dextrose.....	2.5g

(以上培養基之藥材皆購自 BBL , 除 BAP 直接購買現成培養基外, 其餘皆自行配製後高壓滅菌)

## (二) 抗生素紙錠:

Erythromycin (E15) 、 Penicillin (P10) 、  
Vancomycin (VA30) 、 Gentamicin (GM10) 、  
Oxacillin (OX1) 、 Sulbactam with Ampicillin

(SAM20) 、 Sulfamethoxazole with  
Trimethoprim (SXT) 、 Clindamycin (CC2) 、  
Tetracycline (TE30) 、 Cephalothin (CF30) 。  
(製造廠商: BECTON DICKINSON , BBL ;  
國內代理商: 聖誠 電話: 080711686)

## (三) 藥品:

草酸鉍結晶紫、革蘭氏碘液、95% 及 70  
% 乙醇、沙黃 (Safranin) 、 3% 雙氧水、稀  
釋 5 倍之兔血漿、0.95% 食鹽水、蛋黃、  
BaSO<sub>4</sub>、蒸餾水、Ampicillin 、 Agar 。

## (四) 器材:

培養皿、燒杯、試管、量筒、滴管、玻  
片、玻棒、等臂天秤、酒精燈、接種環、試  
管架、無菌牙籤、無菌棉花棒、微量滴管、  
打火機、試管蓋、麥克筆、底片、游標尺。

## (五) 設備:

高壓蒸氣滅菌鍋、無菌操作臺、恆溫培養  
箱、烘箱、冰箱、複式顯微鏡、顯微照相機。

## 三、研究方法:

金黃色葡萄球菌選擇性培養基之最適化

1. 以無菌棉花棒沾取 0.95% 無菌食鹽水。
2. 再以沾濕棉花棒從同一人的鼻腔中採取檢  
體。
3. 在無菌操作臺內, 將棉花棒緻密地塗畫在選  
擇性培養基 (MS , BAP , LSM , 對照組  
LB) 上, 接著旋轉 60° 後緻密塗畫, 再旋  
轉 60° 緻密塗畫, 總計共塗畫三次。
4. 並以麥克筆將取樣之部位、日期、時間、  
對象, 紀錄在培養皿底面上。
5. 將培養皿倒置, 放入恆溫培養箱, 以 35℃  
培養。
6. 三天後取出, 從三種選擇性培養基中各挑

選50個顯現出金黃色葡萄球菌特徵的單一菌落(其中MS挑選菌落顏色為黃色的單一菌落, BAP挑選具溶血特徵的單一菌落, LSM挑選菌落為黃色且菌落周圍有不透明區的單一菌落, 而非選擇性培養基LB則隨機挑選), 以革蘭氏染色法、觸酶測試法(catalase test)(附註一)、凝固酶測試法(coagulase test)(附註二)加以確認菌種是否為金黃色葡萄球菌。

不同部位之樣品採集、培養與鑑定

1. 以無菌棉花棒沾取0.95%無菌食鹽水。
2. 再以沾濕棉花棒分別從40個人(港明高中高二信班同學)的不同部位(口腔黏膜、咽喉、鼻腔、皮膚【選擇無傷口的上臂附近】)採取檢體, 另外從環境中(學校廁所及廚房附近水溝)以無菌試管隨機採40個水溝水檢體。
3. 在無菌操作臺內, 將棉花棒緻密地塗畫在選擇性培養基LSM上, 接著旋轉60°後緻密塗畫, 再旋轉60°緻密塗畫, 總計共塗畫三次。
4. 並以麥克筆將取樣之部位、日期、時間、對象, 紀錄在培養皿底面上。
5. 將培養皿倒置, 放入恆溫培養箱, 以35°C培養。
6. 三天後取出, 依照其菌落特徵加以計數。將確定為金黃色葡萄球菌菌落, 以無菌牙籤全部畫到新LSM上, 並加以編號, 以作為抗生素感受性試驗之用。
7. 由於環境中金黃色葡萄球菌的數量較少, 為順利採得金黃色葡萄球菌, 另外以無菌試管隨機採水溝水檢體, 以微量吸管吸取

0.5ml水溝水檢體, 加入含10%NaCl的TSB培養液中做增殖, 在35°C培養箱中培養二天後, 以棉花棒沾取塗畫在LSM培養基的第一區, 再以接種環畫第二區及第三區, 以得到單一菌落的金黃色葡萄球菌, 每個檢體取3個單一菌落做抗生素感受性試驗。

對抗生素之抗藥性測試

1. 將人體不同部位及水溝中分離到的金黃色葡萄球菌, 各隨機挑選30個單一菌落, 分別接種到TSB培養液中。(其中成大臨床病人採樣期間為89年1月至89年6月, 共計採1732個金黃色葡萄球菌菌落, 此數據由成大醫院病理部細菌室提供)
2. 35°C下培養, 使菌液直至達到或超過Barium Sulfate Standard【McFarland No. 5 Standards】的濃度(此標準溶液由0.048M BaCl<sub>2</sub> 0.5ml加0.36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 99.5ml所配製成而成, 濃度約和1.5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml相當)(附註三)。
3. 用無菌生理食鹽水調整菌液濃度使之與Barium Sulfate Standard的濃度一樣。
4. 以無菌棉花棒沾取懸浮之菌液(壓出多餘的水分)在MH培養基上緻密地塗畫(旋轉60°後再緻密塗畫, 共三次)。
5. 靜置3-5分, 使其乾燥, 但勿超過15分。
6. 將5種不同種類的抗生素紙錠壓貼在MH上(紙錠間距24mm以上, 與邊緣距15mm以上)。
7. 15分鐘後, 倒置培養皿於35°C有氧環境下18小時。
8. 以游標尺測量抑制環直徑大小。判讀標準如下表, 其中R為抗藥性; I(中間型)及

S (敏感型) 皆紀錄為敏感性。

抗藥類型 抗生素種類	R(抗藥型)	I(中間型)	S(敏感型)
E15	< 13	14-22	> 23
P10	< 28		> 29
VA30			> 15
GM10	< 12	13-14	> 15
OX1	< 10	11-12	> 13
SAM20	< 11	12-14	> 15
SXT	< 10	11-15	> 16
CC2	< 14	15-20	> 21
TE30	< 10	11-13	> 14
CF30	< 14	15-17	> 18

單位：mm (資料來源：參考文獻 5)

#### 抗藥性突變株之誘導

1. 先以無菌牙籤將所有部位分離到的金黃色葡萄球菌畫到含 200µg/ml Ampicillin 的 TSB 培養基上，測試其生長情形。
2. 挑選在培養基上無法生長的金黃色葡萄球菌，以 5ml TSB 培養液隔夜培養後，分別取 1ml 的菌液加入最終濃度為 20µg/ml，50µg/ml，80µg/ml，120µg/ml，150µg/ml Ampicillin 的 4ml TSB 培養液中(共 5ml)，再隔夜培養一天。
3. 分別取出 100µl 的菌液，加到含 200µg/ml 的 TSB 培養基中，以彎曲玻棒將菌液均勻塗開，每種濃度皆作 3 個培養皿，隔夜培養之後，計算長出的單一菌落數。

#### 四、研究結果：

由選擇性培養基的菌落特徵判定為金黃色葡萄球菌的準確性

我們選取三種選擇性培養基：木蜜醇培養基(MS)、血液培養基(BAP)、木蜜醇蛋黃

培養基 (LSM)，及一種非選擇性培養基 LB，作為對照之用。從同一人的鼻腔中採取檢體，其中木蜜醇培養基(MS)挑選菌落及周圍為黃色的單一菌落 (見封底圖(甲))，血液培養基(BAP)挑選具溶血特徵的單一菌落 (見封底圖(乙))，木蜜醇蛋黃培養基 (LSM) 挑選菌落為黃色且菌落周圍有不透明區的單一菌落 (見封底圖(丙))，LB 則隨機挑選，做金黃色葡萄球菌的鑑定測試，其結果如表一所示。

表一 三種選擇性培養基由菌落特徵判定為金黃色葡萄球菌的準確性。LSM 可以只由菌落特徵便可 100% 判斷是否為金黃色葡萄球菌，BAP 則只有 84%，MS 只有 60%，而對照組 LB 更只有 24%。

培養基種類	MS	BAP	LSM	對照組 LB
測試方法				
疑似金黃色葡萄球菌的菌落特徵	黃色	溶血	黃色及不透明區	隨機挑選
挑選的菌落數	50	50	50	50
革蘭氏陽性且為葡萄球菌形狀	48	47	50	15
觸 (+) 菌落數	50	50	50	48
凝固 (+) 菌落數	30	42	50	12
確定為金黃色葡萄球菌的菌落數	30	42	50	12
確定為金黃色葡萄球菌的比例	60%	84%	100%	24%

從表一可以看出，由革蘭氏染色法 (顯微照相見封底圖(丁))，觸酶測試，凝固酶測試作為鑑定依據 (最重要的依據為凝固酶測試)，單獨只由菌落特徵來判斷是否為金黃色葡萄球菌的準確性，對照組 LB 為 24%，MS 為 60%，BAP 為 84%，LSM 為 100%。可知 LSM 為一具高度選擇性的培養基，可以只由菌落特徵便可作為鑑定金黃色葡萄球菌的依據，而且和凝固酶測試一樣準確。

另外，我們也將 MS 上確定為金黃色葡萄球菌的 30 個菌落，BAP 上確定為金黃色葡

葡萄球菌的 42 個菌落，以無菌牙籤畫到 LSM 上，結果都是 100% 出現黃色及不透明區的特徵；將 MS 上確定不是金黃色葡萄球菌的 20 個菌落，BAP 上確定不是金黃色葡萄球菌的 8 個菌落，以無菌牙籤畫到 LSM 上，結果都是 0 % 出現黃色及不透明區的特徵。這也進一步確定，只以 LSM 上的菌落特徵即可準確地判定是否為金黃色葡萄球菌。

金黃色葡萄球菌在正常人體不同部位及環境中出現的比例

在確定 LSM 可以有效地分離金黃色葡萄球菌後，我們便利用 LSM 來分離人體及環境中的金黃色葡萄球菌。為了進一步了解金黃色葡萄球菌在人體不同部位的出現比例及抗藥性比例，從本校高二信班找了 40 位健康的

同學，分別從其口腔黏膜、咽喉、鼻腔、及皮膚採取檢體。至於環境中的金黃色葡萄球菌，則選取本校崇禮大樓廁所及崇美大樓廚房附近的水溝採取檢體。其結果見表二。

由表二可以看出，人體四個不同部位及水溝中，金黃色葡萄球菌並不是優勢菌種，其他菌種所佔的菌落數比例皆在 80% 以上，且出現其他菌種的人數比例也都在 75% 以上。從口腔黏膜及鼻腔分離出帶有其他細菌的比例較低，人數比例分別為 77.5% 及 75%，其他三個部位都在 87.5% 以上，但是除了咽喉以外，其他部位的細菌菌落數比例皆在 91% 以上。由此可知，在正常人體及環境中，金黃色葡萄球菌都不是優勢菌種，只佔整個細菌群集的一小部份，也正因如此，

表二 人體不同部位及環境中出現金黃色葡萄球菌的比例。從咽喉分離出金黃色葡萄球菌的人數比及菌落數比都是最高。註：皮膚及學校水溝中金黃色葡萄球菌的比例為 0，並不代表在這些地方沒有金黃色葡萄球菌存在。

採樣部位 細菌種類	口腔黏膜				咽喉				鼻腔			
	菌落數	菌落數比例	長菌人數	長菌人數比例	菌落數	菌落數比例	長菌人數	長菌人數比例	菌落數	菌落數比例	長菌人數	長菌數比
金黃色葡萄球菌	431	$\frac{431}{9059}$ =4.8%	17	$\frac{17}{40}$ =42.5%	1840	$\frac{1840}{9524}$ =19.3%	24	$\frac{24}{40}$ =60%	2876	$\frac{2876}{35578}$ =8.08%	14	$\frac{14}{40}$ =35%
其他種類的細菌	8628	$\frac{8628}{9059}$ =95.2%	31	$\frac{31}{40}$ =77.5%	7684	$\frac{7684}{9524}$ =80.7%	35	$\frac{35}{40}$ =87.5%	32702	$\frac{32702}{35578}$ =91.92%	30	$\frac{30}{40}$ =75%
採樣部位 細菌種類	皮膚				學校水溝							
	菌落數	菌落數比例	長菌人數	長菌人數比例	菌落數	菌落數比例	長菌採樣數	長菌採樣比例				
金黃色葡萄球菌	0	0	0	0	0	0	0	0				
其他種類的細菌	11111	$\frac{11111}{11111}$ =100%	37	$\frac{37}{40}$ =92.5%	15839	$\frac{15839}{15839}$ =100%	40	$\frac{40}{40}$ =100%				

有些人無法順利分離出金黃色葡萄球菌。

另外，金黃色葡萄球菌佔整個菌落數的比例及人數比例皆以咽喉最高，分別為 19.3% 及 60%，口腔黏膜則分別為 4.8% 及 42.5%，鼻腔為 8.08% 及 35%，其中皮膚及水溝甚至兩者比例皆為 0%。值得一提的，皮膚及學校水溝中金黃色葡萄球菌的比例為 0，並不代表在這些地方沒有金黃色葡萄球菌存在，只說明了以我們的採樣方法，無法得到金黃色葡萄球菌。

由於水溝中無法以同樣方法分離出金黃色葡萄球菌，但是環境中的金黃色葡萄球菌的抗藥性比例對我們的實驗結果十分重要，我們便另以含 10%NaCl 的 TSB 培養液做增殖，在 30 個增殖樣本中共有 14 個有長菌，比例為 46.7%，我們從 14 個有長菌的檢體中每個隨機挑選 3 個單一菌落，成功地分離出 42 個金黃色葡萄球菌的單一菌落，作為抗生素感受性試驗之用。至於皮膚由於不是我們關心的重點，並沒有另外作增殖。

#### 抗生素感受性試驗

我們從口腔黏膜挑選 24 個單一菌落，咽

喉及鼻腔中各挑選 30 個單一菌落，學校水溝中則挑選 42 個單一菌落，利用 10 種抗生素紙錠作標準化的抗生素感受性試驗，至於成大臨床病人的抗藥性數據則由醫院細菌室提供，其結果如表三所示(由於成大醫院只報告 7 種抗生素的結果，我們也只比較這 7 種抗生素抗藥性的差異)。

從表三可以看出，臨床病人在 7 種抗生素中有 5 種抗藥性比例遠大於其他部位，只有 Penicillin 不管在任何地點抗藥性幾乎都是 100%，而 Vancomycin 則不管任何地點都可維持 100% 感受性，可以說是對付金黃色葡萄球菌最有效的抗生素。學校水溝中有 4 種抗生素抗藥性比例為 0，口腔黏膜有 6 種，咽喉有 4 種，鼻腔也有 4 種抗生素抗藥性比例為 0，而臨床病人只有 1 種。在臨床病人的 1732 個檢體中，將疑似院內感染的 120 個檢體單獨統計，結果其抗藥性比一般臨床病人更高，由此可知，院內環境中的金黃色葡萄球菌抗藥性十分嚴重。從這些數據可以清楚知道抗藥性比例的嚴重性，依序為學校水溝 < 正常人體 < 臨床病人。

表三 健康人體不同部位、環境、及臨床病人的金黃色葡萄球菌對不同抗生素的抗藥性比率

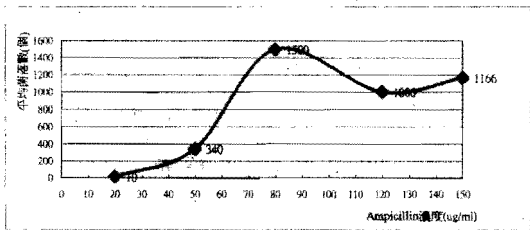
採樣部位 抗藥性種類	口腔黏膜	咽喉	鼻腔	學校水溝	成大臨床病人	疑似院內感染的 成大臨床病人
Erythromycin (E15)	0	16.7%	60%	7.1%	77.9%	85%
Penicillin (P10)	100%	100%	100%	92.9%	97.7%	99.2
Vancomycin (VA30)	0	0	0	0	0	0
Gentamicin (GM10)	0	0	0	0	66.3%	81%
Oxacillin (OX1)	0	0	3.3%	0	66.9%	83%
Clindamycin (CC2)	0	13.3%	0	2.4%	69.9%	77%
Cephalothin (CF30)	0	0	0	0	66.9%	83%
挑選的單一菌落數	24	30	30	42	1732	120

註：成大臨床病人的抗藥性數據由成大醫學院病理部細菌室提供

金黃色葡萄球菌的抗藥性與其先前接觸不同  
抗生素濃度的關係

我們先將各個不同部位分離到的金黃色  
葡萄球菌以無菌牙籤畫到含 200µg/ml Ampicillin 的 TSB 培養基中作測試，結果只有 2 個  
無法生長，我們挑選其中一個編號 M-1(口腔  
黏膜 1 號)作為實驗菌種。

M-1 在五種低濃度 Ampicillin(20µg/ml、  
50µg/ml、80 µg/ml、120 µg/ml、150 µg/  
ml)中培養一天後，原本無法生長在含 200µg/  
ml Ampicillin 的金黃色葡萄球菌，出現了抗  
藥性的突變，其數量和 Ampicillin 濃度之間  
的關係如圖一所示。從圖一可看出，隨著抗  
生素濃度的增加，抗藥性菌種的數量也有增  
加的趨勢，不過從濃度 80µg/ml 之後，突變  
種數量便不再增加，甚至有減少的現象。



圖一 不同濃度抗生素處理與產生抗藥性細菌數  
量的關係圖。隨著抗生素濃度的增加，  
抗藥性菌種的數量也有增加的趨勢。

五、討論：

金黃色葡萄球菌為革蘭氏陽性之球菌，  
大小直徑約 1µm，在顯微鏡下可看到類似一  
串串的葡萄（見封底圖圖(丁)），菌體無內孢  
子及鞭毛，不能運動，具致病力，會造成腫  
脹、形成膿汁，甚至致命的敗血症。通常具  
有下列幾種特性：（1）能產生色素（金黃  
色）。（2）能發酵木蜜醇。（3）具有溶血作

用。（4）能產生凝固。（5）在濃度高達10%  
食鹽的培養基中仍能生存。（6）會產生腸  
毒素，造成食物中毒。（7）具有蛋白酶、  
脂質酶。（詹前朕等 1995，Prescott 等  
1993）

利用上述的幾種特色，我們選取 3 種選  
擇性培養基（詹前朕等 1995，Prescott 等  
1993，Merlino J 1996），比較它們從人體鼻  
腔中分離出金黃色葡萄球菌的比率，以及只  
由菌落特徵來判斷是否為金黃色葡萄球菌的  
準確性。這個結果對我們的後續實驗很重  
要，因為我們想要從人體的不同部位及環境  
中分離金黃色葡萄球菌，比較其抗藥性差  
異，如果無法只由菌落特徵判斷是否為金黃  
色葡萄球菌，或者分離率偏低的話，後續實  
驗會變的很難進行，我們甚至需要以凝固  
測試法去檢測每一個單一菌落，相當耗時也  
不切實際，或者如果分離率偏低，甚至無法  
得到我們所要的金黃色葡萄球菌。

LSM 這種培養基（Merlino J 1996），它  
的成分和選擇原理與 MS 幾乎雷同，只是它  
多了蛋黃的成分，因為金黃色葡萄球菌具有  
脂質酶，因此在 LSM 上除了出現黃色外，菌  
落周圍還會出現一圈蛋黃分解後的不透明區  
（見封底圖(丙)），十分容易判斷。從表一即  
可清楚看出，在 LSM 上，只要出現黃色及不  
透明區的特徵，100% 一定是金黃色葡萄球  
菌，遠高於 BAP 的 84% 及 MS 的 60%，這個  
數據表示 LSM 上的菌落特徵甚至可以作為金  
黃色葡萄球菌的鑑定依據。

金黃色葡萄球菌一般存在於呼吸道黏  
膜、消化道黏膜、排泄物、傷口、大氣、及

周圍所接觸的物品中（詹前朕等 1995，Prescott 等 1993），至於金黃色葡萄球菌在人體不同部位出現的比例，書本上及文獻中均無記載，我們便選擇口腔黏膜、咽喉、鼻腔、及皮膚這四個容易採樣的部位，利用 LSM 來分離金黃色葡萄球菌，分別求出其分離率。結果咽喉的分離率最高，其次分別為口腔黏膜、鼻腔，至於皮膚則無法分離出金黃色葡萄球菌。水溝原本一直無法分離出金黃色葡萄球菌，但由於水溝中金黃色葡萄球菌的抗藥性比例對本實驗十分重要，因此我們另外先以含 10% NaCl 的 TSB 培養液作增殖，也順利的分離出水溝中金黃色葡萄球菌，為了避免得到太多相同的金黃色葡萄球菌，每一個增殖的試管分離出來的金黃色葡萄球菌，我們只取三個單一菌落，做抗生素感受性試驗。

本實驗最主要的目的是要比較健康人體、醫院病人、及環境中金黃色葡萄球菌對抗生素的抗藥性差異，在順利從健康人體及環境中分離出金黃色葡萄球菌後，我們便利用和成大醫院方法一致的標準抗生素感受性試驗，分別求出其對十種抗生素的抗藥性比例，至於醫院病人身上金黃色葡萄球菌的抗藥性比例是由成大醫院病理部細菌室提供。結果如表三所示，正如我們所預期的，抗藥性的嚴重程度以醫院病人最明顯，其次為健康人體，至於水溝中的金黃色葡萄球菌，除了少數第一代的抗生素外，抗藥性並沒有想像中的嚴重。

針對這樣的結果，我們有以下幾點的解釋：（1）醫院病人可能正在服用抗生素，或

者之前曾服用過一段時間的抗生素，導致身上抗藥性金黃色葡萄球菌的比例大增；至於本校高二信班 40 位同學，都是身體健康，近期內無服用藥物紀錄，身上的抗藥性金黃色葡萄球菌的比例相對較低；而學校水溝中的金黃色葡萄球菌接觸抗生素的機率及濃度一定非常低，因此抗藥性金黃色葡萄球菌不具生長優勢，所佔比例最低。也就是說，抗生素抗藥性的嚴重程度和其接觸抗生素的機率成正比，抗生素濫用越嚴重的地方，抗藥性越明顯。（2）如果醫院病人的檢體採樣是在用藥之前，則醫院病人身上的抗藥性金黃色葡萄球菌可能是由於院內感染所致，要證明這個可能性，我們必須另外從醫院的環境中分離金黃色葡萄球菌，檢測其抗藥性比例，如果其抗藥性比例和醫院病人身上相近，才能驗證這個假設，這也是我們下次想探討的問題。不過我們也可從表三看出，從 89 年 1 月至 89 年 6 月，共計採 1732 個金黃色葡萄球菌菌落，所做出來的抗藥性數據中，將其中疑似院內感染的 120 個菌落單獨統計的話，其抗藥性比例除了 Vancomycin 仍是 0 以外，其餘 6 種抗生素皆高於原來的統計，這意味著醫院環境中的金黃色葡萄球菌的抗藥性比例應該是比其他一般的環境中要高出許多，也間接證明醫院環境中的金黃色葡萄球菌抗藥性高於其他環境。（3）從個別抗生素來看，臨床病人在 7 種抗生素中有 5 種抗藥性比例遠大於其他部位，比例高達 70%，學校水溝中有 4 種抗生素抗藥性比例為 0，正常人體的口腔黏膜有 6 種，咽喉有 6 種，鼻腔也有 4 種抗生素抗藥性比例為 0，而臨床病人只有 1



種，這些數據突顯了醫院病人身上抗藥性的嚴重程度。

大多數抗藥性細菌是由於基因改變，然後經藥物篩選產生，抗藥性形成的原因十分複雜，大約可分成兩大類：一、染色體基因突變：由於控制藥物感受性之染色體基因座發生自發性突變，使得受體結構改變而產生。發生自然突變的機率約為  $10^{-7} \sim 10^{-12}$ ，所以此種突變並非抗藥性的常見原因。二、外染色體性抗藥性：這是細菌抗藥性形成的主因。細菌通常具有染色體外的遺傳物質，稱為質體。有一種帶有抗藥性基因的質體稱為 R 因子 (R factor)，可藉由下列方式在細菌之間水平傳遞：1. 轉引作用 (Transduction)：藉由噬菌體的幫忙。2. 轉形作用 (Transformation)：裸露的 DNA 進入其他細菌中。3. 接合作用 (Conjugation)：藉由性因子 (F factor) 幫忙。4. 移位作用 (Transposition)：藉由跳躍基因的幫忙 (詹前朕等 1995, Prescott 等 1993)。在本實驗中，我們感興趣的重點是在不同地點之間的抗藥性差異，不過我們有將菌種保存，在後續實驗中可進行金黃色葡萄球菌抗藥性形成原因的研究。

針對染色體基因突變所產生的新抗藥性基因，我們設計了方法來證實抗生素的濫用確實會使得細菌累積身上的突變，造成抗藥性問題越來越嚴重。在我們的實驗中，一開始是以純種作增殖培養，因此不可能從其他細菌獲得質體而產生抗藥性，而是染色體上的基因發生自發性突變所造成。如圖五所示，突變種數量由 10~1500，假設試管內細菌數量為  $10^{11}$ ，突變率為  $10^{-8} \sim 10^{-10}$ ，由此可

確定此抗藥性突變為染色體上的自發性突變。金黃色葡萄球菌在不同濃度的抗生素 Ampicillin 培養下，若菌種發生突變產生抗藥性，隨著抗生素濃度的提高，突變種的競爭優勢也相對提高，結果如圖五所示，確實可看到抗藥性突變種的數量隨著抗生素濃度的增加而跟著增加，只是濃度超過  $80 \mu\text{g/ml}$  後，突變種數量並不會繼續增加，可能是因為  $120 \mu\text{g/ml}$  及  $150 \mu\text{g/ml}$  的濃度太高，使得一開始的細菌數目無法增殖所致。

抗生素濃度的提高，使得抗藥性突變種的數量隨著增加，意味著抗生素的濫用可導致人體或環境中抗藥性突變種比例隨之增加，這個結果也呼應我們的另一個結論：抗藥性的嚴重程度以醫院病人身上最明顯，其次為健康人體，最後才是水溝中的金黃色葡萄球菌。

人類在利用抗生素對付細菌的同時，細菌也在找尋對策應付人類的攻擊，為了避免自身成為抗藥性菌種的演化溫床，謹守抗生素的使用原則「當用則用，能省則省」，應該是最佳的策略。

## 六、參考文獻：

1. 詹前朕；楊宏通編著，1995，微生物學上冊，華杏出版社
2. Prescott LM；Harley JP；Klein DA，1993，Microbiology，2<sup>nd</sup> edition，Wm. C. Brown Publishers
3. 劉鳳炫；吳竹蘭；李佳縉；陳維仁；廖繼洲；蔡哲雄；江秉誠，1996，Methicillin 抗藥性金黃色葡萄球菌：臨床上的警訊，Chang Gung Med J，19 (4)：291-7

- 4.謝素娥；劉建榮，1995，台灣地區分離之金黃色葡萄球菌凝固型及抗生物質感受性之比較，Chinese J Microbiol Immunol，28：47-58
- 5.國立成功大學醫學院附設醫院病理部微生物組工作手冊，1998年10月修訂
- 6.Merlino J; Gill R; Robertson GJ，1996，Application of lipovitellin-salt-mannitol agar for screening, isolation, and presumptive identification of Staphylococcus aureus in a teaching hospital，J Clin Microbiol，34(12): 3012-5

## 七、誌謝：

感謝成大醫學院微生物及免疫學研究所何漣漪教授，對本篇論文提供許多寶貴的建議與研究方向的指正；成大醫學院病理部細菌室組長黃愛惠小姐提供臨床菌種與抗藥性數據；港明高中王春生校長大力支援經費，且提供一個優良的教學及研究環境，在此一併致上萬分謝意。

### 附註一：

#### 觸酶檢測(Catalase Test) 步驟

- 1.滴一小滴3%  $H_2O_2$  於載玻片上。
- 2.從自己劃分編號之培養基上，以無菌牙籤沾取適當菌量塗至已滴  $H_2O_2$  之載玻片上。
- 3.觀察是否有氣泡產生，有氣泡的即含有觸酶。

### 附註二：

#### 凝固酶檢測(Coagulase Test)步驟

- 1.每隻試管中，加入5mlTSB，蓋上試管蓋並滅菌。
- 2.從自己劃分編號之培養基上，各以接種環

接種至試管中，以35℃培養一天。

- 3.翌日，各加入0.5ml稀釋5倍之兔血漿，再以35℃培養。

- 4.三小時後，取出觀察是否產生凝固現象。

### 附註三：

#### McFarland Standard Solution

McFarland Standard Solution 內含有不同濃度的  $BaCl_2$  及  $H_2SO_4$ ，兩者反應後可產生不同濃度的  $BaSO_4$  沉澱，和試管內的混濁度做比較，即可得出一大約的細菌數，例如本實驗用的是 McFarland No.5 Standard Solution，其混濁度相當於  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml（每毫升的培養液中含有  $1.5 \times 10^8$  個細菌）。

### 封底圖(甲)~(丁)說明：

圖(甲)此為木蜜醇培養基(MS)。左半邊為金黃色葡萄球菌，菌落為黃色；右半邊為其他種類的葡萄球菌，菌落為白色，周圍為紅色。此圖菌落是利用三區塗畫法所得。

圖(乙)此為血液培養基(BAP)。左半邊為金黃色葡萄球菌，菌落周圍具溶血特徵；右半邊為其他種的葡萄球菌，菌落周圍不具溶血特徵。此圖菌落是利用三區塗畫法所得。

圖(丙)此為木蜜醇蛋黃培養基(LSM)。左半邊為金黃色葡萄球菌，菌落為黃色，且周圍有不透明區；右半邊為其他種類的葡萄球菌，菌落為白色，周圍為紅色，無不透明區。此圖菌落是利用三區塗畫法所得。

圖(丁)金黃色葡萄球菌的革蘭氏染色圖。放大倍率1000倍。